

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO NAKAYABU

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA
PRION CELULAR (PrP^C): FERRAMENTAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA
INTERAÇÃO ENTRE PrP^C e Stub1/CHIP**

CURITIBA

2017

BRUNO NAKAYABU

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA
PRION CELULAR (PrP^C): FERRAMENTAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA
INTERAÇÃO ENTRE PrP^C e Stub1/CHIP**

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Orientadora: Adriana F. Mercadante

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, **Paulo e Solange**, por sempre acreditarem em mim e por terem me ensinado os valores essenciais da vida.

Ao meu irmão, **Paulo Henrique**, que, por mais insuportável que seja, continua sendo o meu irmão.

À minha orientadora, professora **Adriana Frohlich Mercadante** (Adri), pela oportunidade de aprendizado, pela orientação neste trabalho, amizade e atenção.
Obrigado!

À **Larissa Richter**, a Lari, pela amizade, por ter me ensinado tudo o que aprendi no laboratório e por nunca ter ficado brava comigo, quando cometi algum erro. Muito, muito, muito obrigado!

À **Sze Mei Lo**, pelos conselhos e sugestões que foram cruciais para o andamento do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia, **Ingrid, Silvia, Carol, Susumu, Karime, Evellyn, Juliano, Valentin, Pierina, Soraia, Camila, Carla e Henrique**, pela amizade e convivência no dia a dia.

Aos amigos da Biologia, **Franco, Vinicius, Isabela, Aline e Fabi**, por tornarem este curso mais “leve”.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho!

“ - Você não escreve sua vida com palavras – explicou o monstro. – Você escreve com ações. O que você pensa não é tão importante. Só é importante o que você faz” – Sete minutos depois da meia-noite (Patrick Ness)

RESUMO

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) são doenças neurodegenerativas e fatais caracterizadas pela mudança de conformação da proteína prion celular (PrP^{C}) para uma isoforma patogênica e transmissível denominada prion scrapie (PrP^{Sc}). PrP^{C} é uma glicoproteína de aproximadamente 33-35 kDa localizada na superfície externa da membrana plasmática. Está presente principalmente no sistema nervoso central e é bastante conservada evolutivamente entre as espécies. Gimenez et al. (2015) identificaram a proteína Stub1/CHIP como potencial ligante da proteína prion celular (PrP^{C}). Esta interação foi confirmada com a realização de ensaios como *pull-down* e co-imunoprecipitação (Co-IP). Stub1/CHIP é uma co-chaperona citoplasmática envolvida na degradação, via sistema ubiquitina proteassomo, de proteínas mal dobradas e, portanto, possui importância no contexto das doenças neurodegenerativas. Uma vez identificada a ligação entre Stub1/CHIP e PrP^{C} , é necessário esclarecer quais domínios são importantes para a ocorrência desta interação. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo expressar e purificar domínios estruturais de PrP^{C} para serem utilizados como ferramentas no estudo da interação com Stub1/CHIP. Utilizando técnicas em biologia molecular, foram planejados a expressão e purificação de cinco domínios de PrP^{C} correspondentes aos resíduos 23-94, 23-153, 23-194, 134-231 e 154-231. As sequências de DNA correspondentes a estes domínios foram clonados no vetor de expressão pRSET e, após sequenciamento, os plasmídeos foram transformados em bactérias da linhagem BL21 Star (DE3). Dos 5 domínios inicialmente planejados, apenas o domínio 23-153 foi expressado e purificado com sucesso. Entretanto, o rendimento desta purificação foi de 3,4 mg/mL. Para melhorar o rendimento e contornar os problemas obtidos com os demais domínios, alterações devem ser realizadas nos protocolos utilizados neste trabalho. Após estas alterações, será possível a produção das ferramentas que auxiliarão no estudo da interação entre Stub1/CHIP e a proteína prion celular (PrP^{C}).

Palavras-chave: Proteína prion celular (PrP^{C}); Interação proteica; Stub1/CHIP.

ABSTRACT

Transmissible spongiform encefalopathies (TSEs) are neurodegenerative and fatal diseases characterized by conformational changes in the structure of native prion protein (PrP^{C}). These conformational changes result in a pathogenic and transmissible isoform called prion scrapie (PrP^{Sc}). PrP^{C} is a 33-35 kDA glycoprotein bound to the external plasmatic cell membrane through a glycosilfosfatidilinositol (GPI) molecule. It is expressed mainly in the central nervous system and it is evolutionary well conserved among species. Gimenez et al. (2015) identified Stub1/CHIP as a potential ligand to cellular prion protein (PrP^{C}). This interaction was confirmed by pull-down and co-immunoprecipitation (Co-IP). Stub1/CHIP is a cytoplasmic co-chaperone involved in the degradation of misfolded proteins through ubiquitin-proteasome system. Thus, Stub1/CHIP has an important role in the context of neurodegenerative diseases. Once the interaction between Stub1/CHIP and PrP^{C} has been confirmed, it is essential to identify the domains involved in this interaction. For this purpose, this project aimed to express and purify structural domains of PrP^{C} that may work as tools in the Stub1/CHIP interaction study. Using molecular biology techniques, expression and purification of five structural domains of PrP^{C} , related to the 23-94, 23-153, 23-194, 134-231 and 154-231 residues, were intended. DNA sequences related to these domains were cloned in the expression vector pRSET. After the DNA sequencing, plasmids were transformed in BL21 Star (DE3) bacterias. Among the initially five structural domains intended, only 23-153 domain was expressed and purified with success. However, purification yield was too low, 3,4 mg/mL. Alterations in the protocols used in this project are necessary to increase the 23-153 purification yield. Troubles on expression of another domains must also be identified and solved. After these changes, it will be possible the production of the tools that will contribute to the study of Stub1/CHIP and PrP^{C} interaction.

Key-words: Cellular prion protein (PrP^{C}), protein interaction, Stub1/CHIP

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 HISTÓRICO	10
2.2 A PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP ^C): ESTRUTURA E FUNÇÕES.....	12
2.3 CONTROLE DE QUALIDADE DE PrP ^C : ENVOLVIMENTO COM Stub1/CHIP.....	14
3 OBJETIVO	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 VETOR.....	17
4.2 CLONAGEM.....	17
4.3 MINIPREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS.....	19
4.4 SEQUENCIAMENTO	19
4.5 MINI-EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DOS DOMÍNIOS DE PrP ^C	20
4.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS DE PrP ^C	21
4.7 SDS-PAGE/WESTERN-BLOT	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
7 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

A proteína prion celular (PrP^{C}) é uma glicoproteína abundante do sistema nervoso central (SNC) e está envolvida no desenvolvimento das encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) ou doenças priônicas (PRUSINER, 1998). PrP^{C} está situada na superfície extracelular da membrana plasmática por meio de uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e possui massa molecular de aproximadamente 33-35kDa (MEYER *et al.*, 1986).

As TSEs são doenças neurodegenerativas fatais e de ocorrência rara. A manifestação destas doenças pode ser de origem genética, esporádica ou infecciosa como a Insônia Familiar Fatal (IFF), doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) e doença da vaca-louca respectivamente (AGUZZI *et al.*, 2008). Suas causas estão relacionadas com mudanças estruturais na proteína prion celular (PrP^{C}) que resultam em uma isoforma patológica, insolúvel e resistente a proteases denominada prion *scrapie* (PrP^{Sc}). PrP^{Sc} agrega-se e funciona como molde para conversão estrutural de outras moléculas de PrP^{C} , tornando possível, assim, a transmissão da doença para outros indivíduos (PRUSINER, 1998). O caráter de agregação proteica é compartilhada com outras doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer que envolvem as proteínas α -Sinucleína (DIAMANT *et al.*, 2014) e $\text{A}\beta 42$ (KUMAR *et al.*, 2007) respectivamente.

Outro fato interessante compartilhado entre estas doenças é a manifestação em idades avançadas. Alguns estudos sugerem que um dos fatores influentes na manifestação das desordens neurodegenerativas é o “desgaste” da maquinaria responsável pelo controle de qualidade proteica da célula (DICKY *et al.*, 2006). Os principais componentes desta maquinaria são as chaperonas moleculares, principalmente aquelas pertencentes à família das HSPs (*Heat Shock Proteins*). As HSPs, como a HSP70 e HSP90, são capazes de reconhecer regiões hidrofóbicas de proteínas, resultantes de erros traducionais, e, em conjunto com co-chaperonas, auxiliam no redobramento ou na eliminação destas proteínas por degradação via sistema ubiquitina-proteossomo (UPS – *Ubiquitin-Proteasome System*) (revisado por MEYER & BUKAU, 2005).

Recentemente, uma co-chaperona vem ganhando destaque nos estudos relacionados ao câncer e ao mau dobramento proteico, principalmente no contexto das doenças neurodegenerativas (GAO & HU, 2008). Esta co-chaperona, por meio

de seus domínios TPR (*Tetratricopeptide Repeat Domain*) situados na região N-terminal da molécula, é capaz de interagir com a região C-terminal da HSP70/90 e, por isso, é chamada de CHIP (*C-terminus of Hsc70 interacting-protein*). Além dos domínios TPR, existe, também, o domínio *U-Box* que está presente na região C-terminal da molécula e possui atividade E3 ligase, isto é, capacidade de ubiquitinação proteica (BALLINGER *et al.*, 1999; JIANG, 2001). Dessa forma, CHIP também pode ser chamada de Stub1 (*STIP1 homology and U-Box containing protein 1*). Devido a existência destes dois domínios, TPR e U-Box, CHIP/Stub1 representa o *link* entre os processos de dobramento e degradação proteica, este por meio do sistema ubiquitina-proteossomo (UPS).

No contexto das doenças priônicas, Gimenez *et al.* (2015) identificaram a interação entre CHIP/Stub1 e a proteína prion celular (PrP^C). Esta interação foi observada por meio das técnicas de duplo-híbrido em leveduras, co-imunoprecipitação (Co-IP) e *pull-down*. Uma vez observada a interação, é necessário a determinação dos domínios ou regiões envolvidas na ligação entre estas proteínas. Para esta finalidade, domínios de PrP^C precisam ser expressos de forma isolada (mutantes de PrP^C com domínios deletados) e submetidos a novos ensaios de interação com CHIP/Stub1. Este trabalho teve como objetivo, portanto, a produção e purificação dos mutantes de PrP^C para posterior determinação do domínio envolvido na ligação com CHIP/Stub1.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

As Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSEs), também denominadas doenças priônicas, são desordens neurodegenerativas fatais que se manifestam tanto em humanos, quanto em animais (AGUZZI *et al.*, 2008). Em contraste com as doenças de Parkinson e Alzheimer, cujas incidências são mais frequentes, as TSEs são extremamente raras (MAYEUX, 2003). Apesar desta discrepância, estas doenças compartilham entre si o fato de envolver o mau dobramento e agregação proteicas como “gatilhos” para a manifestação de seus sintomas. Logo, embora ocorram com menor frequência, o estudo dos fatores envolvidos na manifestação das TSEs pode ser fundamental para o entendimento de outras doenças neurodegenerativas de incidências mais frequentes.

Os primeiros relatos sobre as doenças causadas por prions datam do século XVIII. Em 1732, foram relatados casos de ovelhas da raça merino, provenientes da Espanha, acometidas por uma doença chamada *scrapie*, que causava extrema coçeira nos animais e enfraquecimento dos membros posteriores e da coluna vertebral. Várias tentativas de se descobrir a causa da *scrapie* foram efetuadas sem sucesso. Alguns acreditavam que tempestades de raios ou algum parasita poderiam ser os responsáveis pela manifestação da doença (LIBERSKI, 2012).

Em 1937, na Escócia, quase dois séculos depois do primeiro relato da *scrapie*, ovelhas foram acidentalmente inoculadas com extratos de cérebro fixados em formalina provenientes de outras ovelhas mortas pela *scrapie*. Após dois anos, as ovelhas inoculadas manifestaram os sintomas da doença e, dessa forma, foi demonstrado pela primeira vez que as TSEs eram passíveis de transmissão (SOTO & CASTILLA, 2004). Posteriormente, CULLIE & CHELLIE (1939) e CHANDLER (1961) demonstraram, experimentalmente, que a *scrapie* poderia ser transmitida para cabras e camundongos respectivamente. O fato de ser possível a transmissão da doença de um animal a outro fez surgir a ideia de que a *scrapie* poderia ser causada por um vírus de ação lenta com propriedades únicas, como resistência a altas temperaturas e tratamento com formalina.

As TSEs em humanos já eram conhecidas a esta altura, como a doença investigada em 1921 por Hans Creutzfeldt e Alfons Jakob, que receberia seus

nomes posteriormente (*Creutzfeldt-Jakob disease* – CJD). Entretanto, ainda não havia sido estabelecido uma relação entre a *scrapie* e as doenças em humanos, passo fundamental para os avanços nas pesquisas com as doenças priônicas. A relação entre estas desordens neurodegenerativas iniciou-se com o estudo pioneiro do Dr. Daniel Carleton Gajdusek, vencedor, em 1976, do prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina “por suas descobertas envolvendo novos mecanismos para a origem e disseminação de doenças infecciosas”.

Gajdusek investigou a epidemia de uma estranha doença, semelhante a encefalite, que atingia uma tribo primitiva da Papua Nova Guiné. Esta doença era totalmente restrita e não estava presente em tribos próximas. Segundo a descrição que fez, a maioria dos indivíduos atingidos eram crianças e mulheres adultas que adquiriam instabilidade motora (tremores e desequilíbrio), instabilidade emocional (alguns riavam constantemente, outros tornavam-se melancólicos e depressivos) e rigidez nos estágios mais avançados da doença. A desordem que investigava era chamada de “Kuru”, denominação cujo significado na língua local era “tremor”. Os estudos de Gajdusek definiram a epidemiologia da doença Kuru e concluíram que a prática do canibalismo, ritual cuja crença estava na aquisição da vitalidade dos mortos, era a responsável pela transmissão e epidemia da doença. Interessantemente, nestes rituais, as mulheres e as crianças, considerados inferiores, alimentavam-se das vísceras e do cérebro, enquanto que os homens adultos alimentavam-se dos músculos, por serem os representantes da “força” dentro da tribo (LIBERSKI, 2012; DESLYS & PICOT, 2002)

Em uma exibição organizada em Londres, onde estavam expostas micrografias da doença Kuru feitas pelo neuropatologista polonês, Igor Klatzo, foi realizada a primeira associação entre a *scrapie* e as TSEs em humanos. William Hadlow, que já havia estudado a doença *scrapie*, ao observar as micrografias da doença Kuru, notou grandes similaridades, levando-o a escrever uma carta para Gajdusek sugerindo uma analogia entre a *scrapie* e a Kuru. Após este evento, Gajdusek demonstrou que a Kuru era transmitida para chimpanzés e intensificou seus esforços para tentar isolar o agente responsável pela doença, que, até então, acreditava-se ser de origem viral. A semelhança, também, com a CJD levou o grupo de pesquisa de Gajdusek a demonstrar sua transmissibilidade (LIBERSKI, 2012).

O agente responsável pelas doenças investigadas parecia ter propriedades únicas que eram distintas dos agentes mais comuns, como vírus, bactérias ou

parasitos. A resistência a tratamentos que inativavam ácidos nucleicos levou pesquisadores a elaborarem outras hipóteses alternativas para explicar a natureza do agente causador das TSEs. Em 1967, Griffith formulou a hipótese (“*The protein-only hypothesis*”) de que tais doenças poderiam ser causadas e transmitidas por alguma proteína com capacidade de replicação no indivíduo. Esta hipótese foi levada adiante por Stansley B. Prusiner, ganhador, em 1997, do prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina. Prusiner introduziu o termo “*prion*” cujo significado é “partícula proteica infecciosa” (SOTO & CASTILLA, 2004).

A nova hipótese, de que as TSEs eram causadas unicamente por uma proteína com capacidade de replicação, enfrentou resistência inicialmente. Entretanto, fortes evidências estavam à favor da hipótese. A purificação da proteína agregada, PrP^{Sc} (prion *scrapie*), a partir de material contaminado, permitiu a identificação e clonagem do gene que codifica a proteína prion celular (PrP^C), forma nativa (LIBERSKI, 2012). Logo, descobriu-se que esta proteína poderia assumir duas formas: a nativa (PrP^C), presente em vários tecidos, mas principalmente no neuronal, e a forma infecciosa (PrP^{Sc}), a qual se apresenta na forma agregada e apenas em material contaminado. Estas duas isoformas apresentam a mesma sequência primária de aminoácidos, diferindo uma da outra apenas em sua estrutura terciária ou tridimensional.

Outra forte evidência foi o estudo com camundongos nocautes para PrP^C. Nestes estudos, observou-se que, ao inocular camundongos nocautes com material infectado, estes não adquiriam a doença, sugerindo que a proteína nativa é essencial para a manifestação das TSEs (BUELER *et al.*, 1992; BUELER *et al.*, 1993). A nova hipótese também explicava o fato das TSEs se manifestarem na forma adquirida, esporádica ou familiar, com o envolvimento de mutações no gene *PRNP*. Apesar de intensa pesquisa, atualmente ainda não há o conhecimento de quais mecanismos e fatores levam à conversão da forma nativa da proteína prion, PrP^C, para a forma infecciosa, PrP^{Sc}. Além disso, as principais funções fisiológicas da PrP^C ainda não foram totalmente elucidadas.

2.2 A PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP^C): ESTRUTURA E FUNÇÕES

O termo “prion” deriva de “*proteinaceous infectious particles*”, e foi utilizado primeiramente por Prusiner, em 1982, para designar o agente causador das

encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) (PRUSINER et al., 1982). As doenças priônicas, que podem ser de natureza esporádica (sCJD), genética (Gertsman-Straussler-Scheinker – GSS) ou infecciosa (Kuru, CJD iatrogênica e variante), resultam da conversão da proteína normal prion celular (PrP^{C}), rica estruturalmente em α -hélices, para uma conformação defeituosa denominada scrapie (PrP^{Sc}) cuja estrutura é rica em folhas β (COLLINGE J, 2005; LINDEN et al., 2008). A mudança de conformação vem acompanhada, também, de alterações em suas propriedades bioquímicas, tais como a resistência à degradação por proteinase K e, principalmente, a insolubilidade que provoca, por consequência, a neurodegeneração pela agregação proteica (MEYER et al., 1986).

PrP^{C} é uma glicoproteína de ~33-35 kDa que está ligada à membrana plasmática por meio de uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol). É expressa em vários tipos celulares, mas principalmente no sistema nervoso central (BENDHEIM et al., 1992). Em relação à sua estrutura (FIGURA 1), seus principais domínios estão compreendidos na região N-terminal.

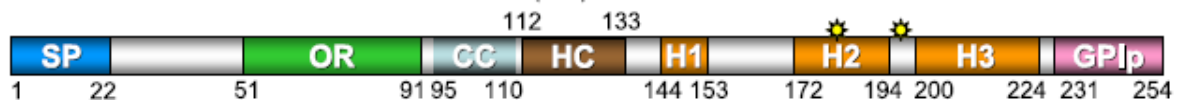


FIGURA 1 – Principais domínios estruturais da proteína prion celular (PrP^{C}).

FONTE: LINDEN *et al.* (2007)

Esta região possui uma sequência sinal N-terminal, entre os aminoácidos 1 e 22, responsável por endereçar a proteína para o lúmen do retículo endoplasmático. Este peptídeo sinal é seguido por uma região de 5 repetições octopeptídicas $(\text{PHGGGWGQ})_{5x}$ entre os aminoácidos 51-91. Em seguida, há um domínio carregado positivamente, compreendido entre os aminoácidos 100-109, e um domínio hidrofóbico, entre os aminoácidos 111-134. A região C-terminal é composta por um domínio globular formado por três α -hélices que são interespaçadas por duas folhas- β . Nesta região, uma ligação dissulfeto formada entre os resíduos de Cisteína, Cys179 e Cys214, estabiliza a molécula. Além disso, há dois sítios de glicosilação presentes nos resíduos de Asparagina, Asn181 e Asn197. Dessa forma, a proteína prion pode se apresentar na forma não glicosilada, mono- ou diglicosilada. Por fim, a molécula não processada apresenta uma outra sequência sinal na região C-terminal. Esta sequência sinal é clivada no interior do retículo plasmático para

inserção da molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (COLLINGE J, 2005; LINDEN *et al.*, 2007).

Os domínios apresentados são importantes para a manutenção da estabilidade da proteína em condições fisiológicas. Apesar da conversão estrutural de PrP^C para a isoforma infectante, PrP^{Sc}, ainda não estar completamente compreendida, acredita-se que alterações que interfiram nestes domínios possam contribuir para a manifestação das doença. A ligação de íons cobre (Cu²⁺) no domínio OR, por exemplo, é responsável por estabelecer uma interação interdomínio entre a região N-terminal e a C-terminal. Esta interação garante que o domínio hidrofóbico da proteína, entre os aminoácidos 111-134, que está associado à neurotoxicidade, não fique exposto. Fatores capazes de romper esta ligação interdomínio, como anticorpos capazes de se ligar em epítomos específicos ou, até mesmo, PrP^{Sc}, podem favorecer o surgimento da função neurotóxica de PrP^C (EVANS *et al.*, 2016). A ligação de íons cobre (Cu²⁺) também é importante para a reciclagem de PrP^C, uma vez que tem envolvimento com o processo de endocitose da molécula (BELLAND & ROUCOU, 2012).

2.3 CONTROLE DE QUALIDADE DE PrP^C: ENVOLVIMENTO COM Stub1/CHIP

Por ser uma glicoproteína de membrana, PrP^C possui um peptídeo sinal de 22 aminoácidos na região N-terminal que, durante a tradução, é o responsável por seu endereçamento para o retículo endoplasmático. Uma vez no retículo e após clivagem do peptídeo sinal, a proteína recebe a âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) em sua região C-terminal e sofre glicosilações, podendo dar origem a moléculas não glicosiladas ou mono/diglicosiladas. Após esta etapa da biossíntese, PrP transita do retículo para o complexo de Golgi, onde poderá sofrer glicosilações adicionais, e, pela via de secreção, é enviada para o estabelecimento na superfície externa da membrana plasmática. Na membrana, PrP^C pode ser endocitada por compartimentos endossomais, sendo reciclada novamente para a superfície da membrana ou destinada aos lisossomos para degradação (CHAKRABARTI *et al.*, 2009).

Durante a sua biossíntese, PrP^C pode ser alvo, no retículo endoplasmático, do mecanismo de controle de qualidade proteica denominado ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). Basicamente, as proteínas que não realizam

seu dobramento correto no retículo endoplasmático são reconhecidas por chaperonas e, por consequência, são translocadas novamente para o citosol, onde ocorrerá a remoção das glicosilações por N-glicanases e a atuação das enzimas ubiquitina E3 ligases na sinalização para a degradação via proteossomo. As evidências de que o processamento de PrP envolve o ERAD surgiram com os estudos de YEDIDIA *et al.* (2001) e MA & LINDQUIST (2001) ao demonstrarem que o tratamento de células com inibidores de proteossomo leva a um maior acúmulo de PrP no citoplasma em comparação com células não tratadas, indicando, dessa forma, que o proteossomo estaria envolvido em seu processamento. Recentemente, SHAO *et al.* (2014) descobriram a enzima gp78, uma proteína integral de membrana do ER que pertence a família das enzimas E3 ligases e realiza, especificamente, a ubiquitinação de PrP^C.

Foi demonstrado que mutações em PrP, relacionadas com as doenças priônicas, podem inibir a atividade do proteossomo, favorecendo, assim, o surgimento de PrPs citosólicos que podem produzir efeitos tóxicos na célula (KRISTIANSEN *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2002). Os PrPs citosólicos também podem ser originados por uma via independente do ERAD. Como PrP possui um peptídeo-sinal ineficiente, em algumas ocasiões não há o reconhecimento deste peptídeo e a proteína não é translocada para o retículo endoplasmático, permanecendo no citosol. Os prions citosólicos estão sendo associadas com possível participação no desenvolvimento das doenças priônicas, desempenhando papel neurotóxico (MA J *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2009). Porém, em sentido contrário, há estudos que mostram que estas isoformas de prions não são tóxicas e podem até mesmo desempenhar função neuroprotetora, dependendo do tipo celular (RESELLI *et al.*, 2010; FIORITI *et al.*, 2005).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir mutantes da proteína prion celular (PrP^C) para posterior determinação dos domínios importantes para a interação com CHIP/Stub1.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Utilizar técnicas em biologia molecular para clonar, em vetor de expressão em bactérias, as sequências de DNA correspondentes aos domínios estruturais de PrP^C murino compreendidos entre os resíduos 23-94, 23-153, 23-194, 134-231 e 154-231 (FIGURA 2)
- Expressar em bactérias e purificar os domínios estruturais citados, utilizando cromatografia de afinidade.

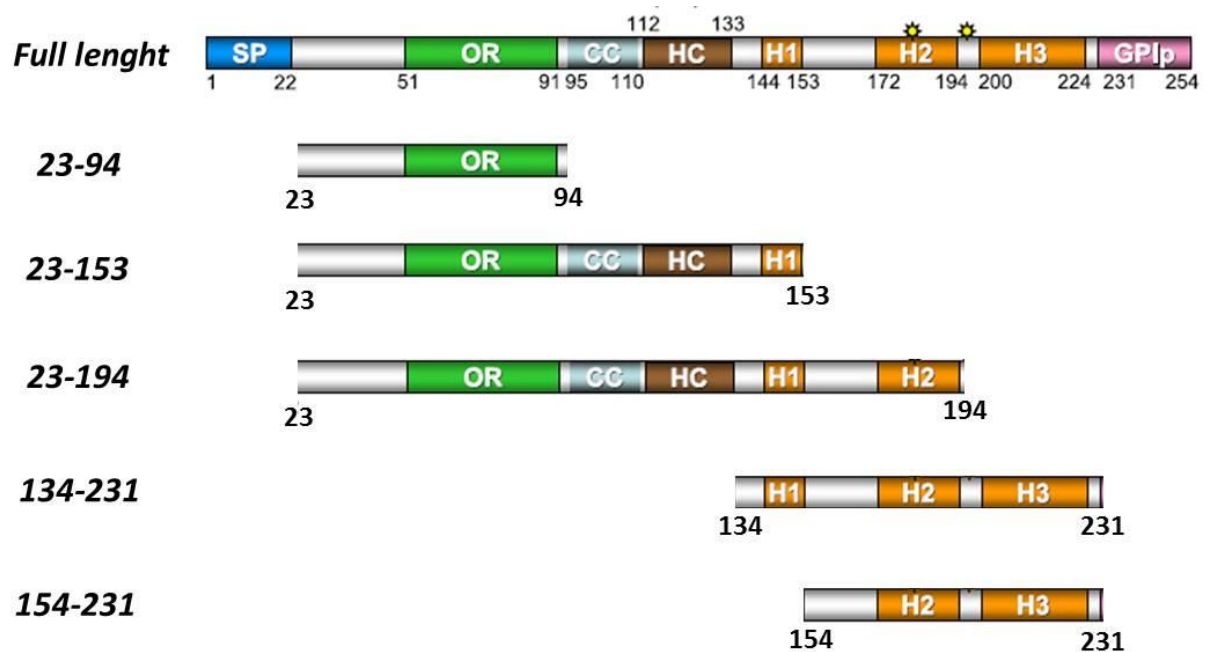


FIGURA 2 – Esquematisação dos domínios estruturais de PrP^C, 23-94, 23-153, 23-194, 134-231 e 154-231, planejados para expressão e purificação (SP = *Signal Peptide*; OR = *Octopeptide Repeats*; CC = *Charged Cluster*. HC = *Hydrofobic Cluster*; H1 = α -Hélice 1; H2 = α -Hélice 2; H3 = α -Hélice 3; GPIp = Glicosilfosfatidilinositol signal peptide).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 VETOR

Para realizar as etapas de amplificação (PCR) das sequências de DNA correspondentes aos domínios estruturais citados, utilizou-se como molde (*template*) o vetor de expressão pRSET (FIGURA 3), contendo, entre os sítios de restrição BamHI e EcoRI, a sequência inteira codificante da proteína prion celular (PrP^C). Os insertos clonados no vetor pRSET ficam sob regulação do promotor T7 de bacteriófagos, e permite a expressão e purificação de proteínas fusionadas a seis resíduos de histidina (His₆). Além disso, o vetor apresenta o gene de resistência ao antibiótico ampicilina, permitindo a seleção de transformantes.

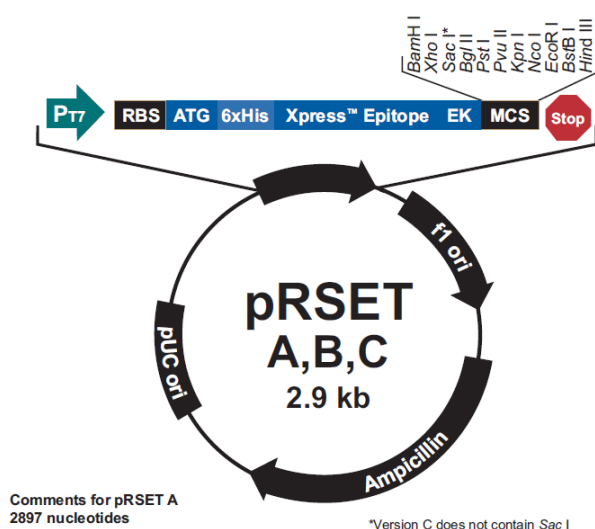


FIGURA 3 – Mapa do vetor pRSET utilizado nas etapas de clonagem dos insertos correspondentes aos domínios estruturais de PrP^C.

4.2 CLONAGEM

A obtenção dos insertos correspondentes aos domínios estruturais foi realizada por meio de PCR. A PCR foi realizada em 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C (1-3 minutos), desnaturação a 95°C (30 segundos), anelamento dos *primers* a 52°C (30 segundos), extensão da cadeia nucleotídica a 72°C (2 minutos), e extensão final a 72°C (10 minutos). A enzima utilizada foi a *Pfu* DNA polimerase 2,5 U/μl (*Thermo Scientific*). Em todas as

sequências dos *primers*, foram adicionados os sítios de restrição das enzimas BamHI ou EcoRI para posterior etapa de clonagem. As sequências dos *primers* utilizados estão demonstradas na TABELA 1. Os nucleotídeos sublinhados referem-se aos sítios de restrição das enzimas BamHI (GGA TCC, em vermelho) e EcoRI (GAA TTC, em azul).

TABELA 1 SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA PCR

Primers	Sequência
23-94 Forward	5' TAT <u>GGA TCC</u> AAA AAG CGG CCA AAG 3'
23-94 Reverse	5' TAT AT <u>G AAT TC</u> T CAG GTA CCC CCA C 3'
23-153 Reverse	5' TAT AT <u>G AAT TC</u> T CAC ATG TTT TCA CGG 3'
23-194 Reverse	5' TAT AT <u>G AAT TC</u> T CAC CCC TTG GTG GTG 3'
134-231 Forward	5' TAT <u>GGA TCC</u> AGC AGG CCC ATG ATC 3'
134-231 Reverse	5' TAT AT <u>G AAT TC</u> T CAG CTG GAT CTT CTC C 3'
154-231 Forward	5' TAT <u>GGA TCC</u> TAC CGC TAC CCT AAC CAA G 3'

O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1%, durante 1 hora a 75 volts. Após a etapa de eletroforese, as sequências foram purificadas por meio do kit comercial de gel extração, QIAquick[®] Gel Extraction (Qiagen). A concentração final de DNA, purificado a partir do gel, foi mensurada por meio do equipamento NanoDrop[™].

Após a etapa de gel extração, os insertos foram submetidos a uma reação de dupla digestão com as enzimas BamHI (*Fermentas*) e EcoRI (*Thermo Scientific*), assim como o plasmídeo contendo a sequência inteira de PrP^C. Nas reações de digestão, 3 µg do plasmídeo pRSET-PrP^C e aproximadamente 500 ng dos insertos foram digeridos, separadamente, durante 16 horas (*overnight*) e a 37°C com o dobro de volume da enzima BamHI em relação a EcoRI. As reações foram inativadas a 80°C durante 20 minutos. Em seguida, os produtos das reações de digestão foram submetidos, novamente, a eletroforese em gel de agarose a 1% e purificadas com o kit de gel extração mencionado anteriormente.

Por fim, os insertos digeridos foram clonados no vetor pRSET por meio de reações de ligação com a enzima T4 DNA ligase (*Thermo Scientific*). As reações foram feitas nas seguintes condições: concentrações de vetor e inserto na razão molar de 1:5 (a razão molar foi calculada no endereço eletrônico: www.insilicouni-

duesseldorf.de/Lig_Input.html), T4 Buffer 1X, T4 DNA ligase 1U, e volume completado para 20µl com H₂O ultra-pura. A reação de ligação foi mantida durante 1 hora a temperatura ambiente (22°C) e, após este tempo, foi inativada a 70°C durante 20 minutos.

4.3 MINIPREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Para amplificação dos plasmídeos e posterior verificação do processo de clonagem, aproximadamente 1-10 ng do produto da reação de ligação foi transformado em bactérias *E. coli* (DH5α) eletrocompetentes. Após a transformação, as bactérias foram recuperadas em 1ml de meio LB (*Luria-Bertani*, 10 g/L triptona, 10 g/L NaCl e 5 g/L de extrato de levedura) durante 1 hora a 37 °C. Dado o tempo, as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo o antibiótico ampicilina na concentração final de 50 µg/mL. Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB mais o antibiótico (50 µg/mL) e incubadas *overnight* (~16 horas) e a 37 °C sob agitação constante. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 6000 xg por 10 minutos para iniciar o processo de purificação dos plasmídeos com o kit comercial *PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep kit* (Invitrogen). Os produtos da minipreparação foram utilizados para o sequenciamento e nova reação de digestão (descrito no item 4.2) para verificar a integridade do processo de clonagem.

4.4 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento dos plasmídeos resultantes da clonagem foi feito pelo método de Sanger em eletroforese capilar. Neste método, a PCR é realizada com uma mistura de dNTPs (deoxinucleotídeo) e ddNTPs (dideoxinucleotídeos). A extensão da molécula de DNA pela DNA polimerase é realizada no sentido 5' → 3', e há a necessidade de um oligonucleotídeo (*primer*) ligado à fita com uma extremidade 3'-OH livre para que a extensão ocorra. A ligação dos ddNTPs, que não possuem a extremidade 3'-OH livre, interrompe o processo de extensão da fita de DNA. Dessa forma, é possível determinar a sequência do DNA a partir da identificação da última base nitrogenada adicionada à fita.

O sequenciamento dos plasmídeos foi feito com o kit comercial *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems™). O primer utilizado nas

reações anela-se ao promotor T7 do vetor e possui a sequência 5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3'. As reações de PCR do sequenciamento foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos que se iniciam a 96 °C por 15 segundo (desnaturação), 50 °C por 15 segundos (anelamento do *primer*), e 60 °C por 4 minutos (extensão da fita).

Para realizar a precipitação dos produtos da PCR, a cada amostra foi adicionado um volume de solução de acetato de sódio 1,5 M + EDTA 0,25 M correspondente a 10% do volume da reação de PCR, e 3 volumes de etanol absoluto. Após homogeneização, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 4 °C e, em seguida, centrifugadas a uma velocidade de 20,000 xg, durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante desta centrifugação foi descartado delicadamente. O DNA foi lavado com 500 µL de etanol a 70% e centrifugado novamente nas mesmas condições da centrifugação anterior. Novamente, o sobrenadante foi descartado, e as amostras foram mantidas em estufa a 37 °C durante 1 hora para evaporação de quaisquer resíduos de etanol. Após a precipitação, o DNA foi ressuspensionado em 10 µL de formamida, seguido de aquecimento a 95 °C durante 5 minutos em banho seco. O sequenciamento foi realizado pelo sequenciador Applied Biosystems® 3500 and 3500xL Genetic Analyzers (Life Technologies).

A análise das sequências foi realizada com a ferramenta *Clustal Omega* (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e o *software* Chromas.

4.5 MINI-EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DOS DOMÍNIOS DE PrP^C

A expressão dos domínios estruturais de PrP^C foi realizada em bactérias *E.coli* BL21 (DE3) STAR eletrocompetentes. Após a transformação, as bactérias foram recuperadas em 1 mL de meio LB, durante 1 hora a 37 °C e, em seguida, foram plaqueadas em meio LB-ágar+ampicilina (50 µg/mL) para obtenção de colônias isoladas. A partir das colônias isoladas, foram realizados os pré-inóculos em 5ml de meio LB + ampicilina na concentração final de 50 µg/mL. O pré-inóculo foi mantido por 16 horas sob agitação constante e a 37°C. Após o tempo de crescimento das bactérias, foi realizado o inóculo em 10ml de meio LB na razão de 1:500, a partir do pré-inóculo. O inóculo foi mantido sob agitação constante e a 37°C por aproximadamente 2-3 horas até alcançar uma D.O (Densidade Óptica) entre 0,5-0,6 em comprimento de onda de 600 nm. Após alcançar estes valores, alíquotas de

1 mL foram separadas como controle negativo (bactérias não induzidas), e o volume restante foi induzido com 0,5 mM de IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) durante 16 horas, a 25°C e sob agitação constante. Dado o tempo de expressão das bactérias, 1ml das bactérias induzidas e não induzidas foram centrifugados a 6.000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuscitado em 100 μ L de tampão de amostra redutor 1X para ser aquecido a 100°C durante 20 minutos. A mini-expressão dos domínios estruturais de PrP^C foi analisada por *SDS-PAGE* em gel de 15% corado com Azul de Coomassie.

Para verificar se os domínios estruturais estavam na fração solúvel ou insolúvel, novamente foi realizado a mini-expressão dos domínios estruturais em 10ml de meio LB como mencionado anteriormente. Após o tempo de expressão, todo volume das bactérias foi centrifugado e ressuscitado em 300 μ L de tampão de lise (Tris-Hcl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, PMSF 1 mM) para ser lisado em sonificador (4 ciclos de 15 segundos a uma potência de 90%). Após a etapa, o lisado foi centrifugado a 13.000 xg por 10 minutos a 4 °C, e *pellet* e sobrenadante foram separados para análise em *SDS-PAGE* a 15%.

4.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS DE PrP^C

Após a verificação da solubilidade e a expressão em pequena escala, os domínios estruturais foram produzidos em larga escala (em 100ml de meio LB). A expressão foi realizada nas mesmas condições determinadas anteriormente (indução com 0,5mM de IPTG, 16 horas e a 25°C). A análise da solubilidade dos domínios demonstrou que estes estavam presentes em corpos de inclusão, isto é, na fração insolúvel. Dessa forma, depois do tempo de expressão, as bactérias foram centrifugadas a 6000 xg por 10 minutos a 4°C e ressuscitadas em 10ml de tampão de lise (Tris-Hcl 50mM, pH 8.0, EDTA 1mM, NaCl 50mM, PMSF 1mM). Em seguida, as bactérias foram lisadas em *French Press* para dar início a etapa de lavagem dos corpos de inclusão. O lisado foi centrifugado a 6.000 xg por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante desta etapa foi descartado. O *pellet* foi lavado 2 vezes em 5ml de tampão de lavagem 1 (5mM EDTA, 5mM DTT, 2M Uréia e Triton X-100 2%), e 2 vezes em tampão de lavagem 2 (PBS 1x, 5mM EDTA). As centrifugações entre as lavagens foram realizadas a uma velocidade de 9.000 xg durante 30 minutos a 4°C.

Após a lavagem dos corpos de inclusão, seguiu-se à etapa de solubilização dos domínios. O *pellet* resultante das lavagens foi ressuspendido em 10ml de tampão desnaturante (10mM Tris-HCl, pH 6.8, 100mM NaH₂PO₄, 8M de Uréia, 10mM de imidazol). Após a total solubilização, o *pellet* foi centrifugado a 9.000 xg durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante desta etapa foi recuperado, e o pH foi ajustado para 7,0.

A purificação foi feita por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. O sobrenadante, com a proteína recombinante solubilizada, foi incubada com 500µl de resina Ni-NTA agarose, durante 1,5 horas, a temperatura ambiente e em homogenizador. Após o tempo de incubação, a resina foi imobilizada em coluna para permitir a passagem do sobrenadante. O “*flowthrough*” foi recuperado e seguiu-se às etapas de lavagem com 10ml de tampão de lavagem 1 (8M de Ureia, 100mM NaH₂PO₄, 150mM NaCl e 20mM de imidazol), e 10ml de tampão de lavagem 2 (8M de Ureia, 100mM NaH₂PO₄, 150mM NaCl e 40mM de imidazol). Por fim, a proteína recombinante foi recuperada com 10ml de tampão de eluição (8M de Ureia, 100mM NaH₂PO₄, 150mM NaCl e 500mM de imidazol). O eluato foi recuperado em frações de 1ml. A análise da etapa de purificação foi determinada por *SDS-PAGE* a 15% corado com Azul de Coomassie.

4.7 SDS-PAGE/WESTERN-BLOT

Para ter certeza de que a proteína expressa tratava-se da proteína de interesse, os extratos de bactérias foram novamente submetidas a *SDS-PAGE* a 15%, seguido de transferência em *semi-dry* das proteínas para membrana de nitrocelulose. A detecção da expressão foi realizada com anticorpos policlonais anti-PrP^C produzidos em laboratório.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, os *primers* produzidos foram submetidos a teste para verificar se realmente estavam amplificando as sequências de interesse. A TABELA 2 mostra o peso molecular aproximado de cada domínio estrutural, além do tamanho esperado (número de nucleotídeos) das sequências de DNA amplificadas, a partir dos *primers* produzidos.

TABELA 2 PESO MOLECULAR E TAMANHO DOS INSERTOS ESPERADOS

Domínio	Nº de nucleotídeos	Nº de aminoácidos	Peso Molecular
23-94	216	72	8 kDa
23-153	393	131	14,541 kDa
23-194	516	172	19,314 kDa
134-231	294	98	11 kDa
154-231	234	78	8,5 kDa
Full-Lenght	765	254	28,2 kDa

Como demonstrado na FIGURA 4, após PCR e separação por eletroforese, os insertos apresentaram o tamanho esperado. Os *primers* utilizados para amplificar as sequências correspondentes aos domínios 134-231 e 154-231 estavam, aparentemente, ligando-se de forma inespecífica ao plasmídeo pRSET-PrP^C. Para contornar o problema, outro plasmídeo com a mesma sequência de PrP^C (EGFP-PrP^C) foi utilizado como DNA molde na PCR.

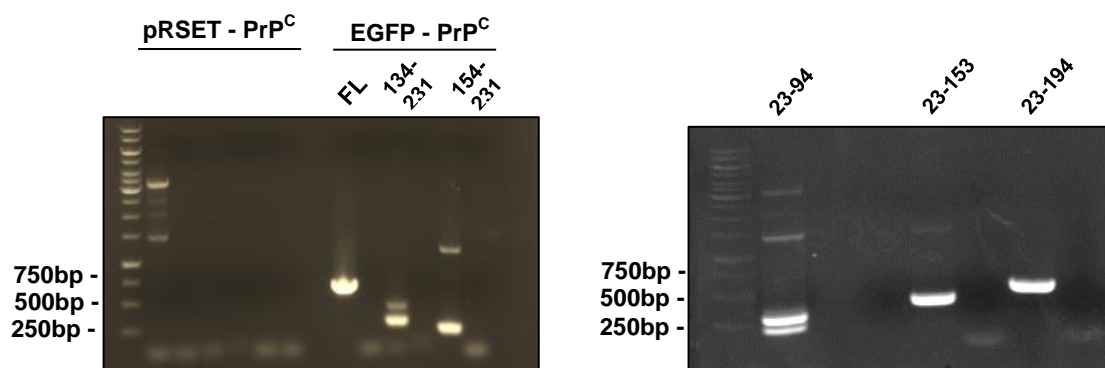


FIGURA 4 Amplificação das sequências correspondentes aos domínios estruturais de PrP^C. *Primers* para amplificar as sequências dos domínios 134-231 e 154-231 foram ineficientes com o DNA molde pRSET-PrP^C. Dessa forma, foi utilizado o plasmídeo EGFP-PrP^C para amplificar estas sequências.

Após a purificação por meio de gel extração, os insertos foram clonados no vetor pRSET entre os sítios de restrição, BamHI e EcoRI. O sucesso da clonagem foi verificada por reações de restrição com as mesmas enzimas e separação por eletroforese em gel de agarose a 1% (FIGURA 5). A clonagem da sequência correspondente ao domínio 23-94 não foi bem sucedida, devido ao não crescimento de bactérias transformadas com o plasmídeo produzido após a reação de ligação.

A possibilidade de mutações que pudessem alterar a sequência de aminoácidos dos domínios estruturais foi eliminada por meio de sequenciamento. O alinhamento das sequências demonstrou que não houve mutações durante a etapa de clonagem (FIGURA 6).

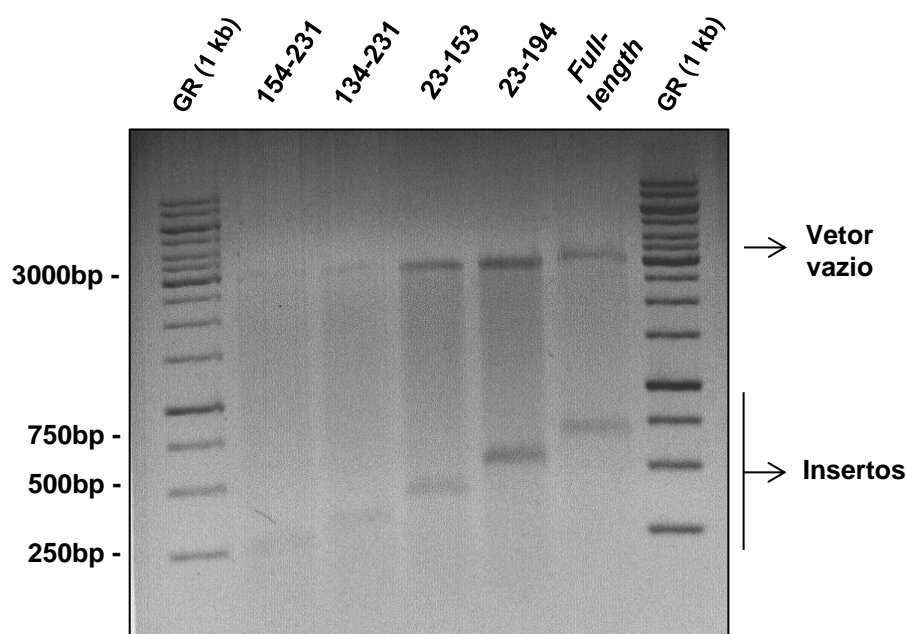


FIGURA 5 Eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a eficiência da etapa de clonagem. Os plasmídeos produzidos foram digeridos com as enzimas, BamHI e EcoRI, para liberação dos insertos. (GR = Gene Ruler).

A expressão dos domínios estruturais foi realizada em bactérias *E. coli* da linhagem BL21 Star (DE3). Os domínios 23-153 e 134-231 foram expressados de forma satisfatória a 25°C, 16 horas e 0,5 mM de IPTG. Entretanto, a expressão dos domínios 23-194 e 154-231 não foi semelhante nas mesmas condições. Além disso, a análise do gel corado com Azul de Coomassie demonstrou que as bactérias não induzidas (controle negativo, sem IPTG) também estavam expressando os domínios estruturais. Para controlar a expressão basal e contornar o problema, foi adicionado, ao meio de crescimento bacteriano, D-glicose na concentração final de 1% (m/v) (FIGURA 7). A adição de D-glicose diminuiu a expressão dos domínios nas bactérias

não-induzidas, mas esta diminuição da expressão também ocorreu nas bactérias induzidas com IPTG, o que levaria a um rendimento menor de proteínas recombinantes na etapa de purificação.

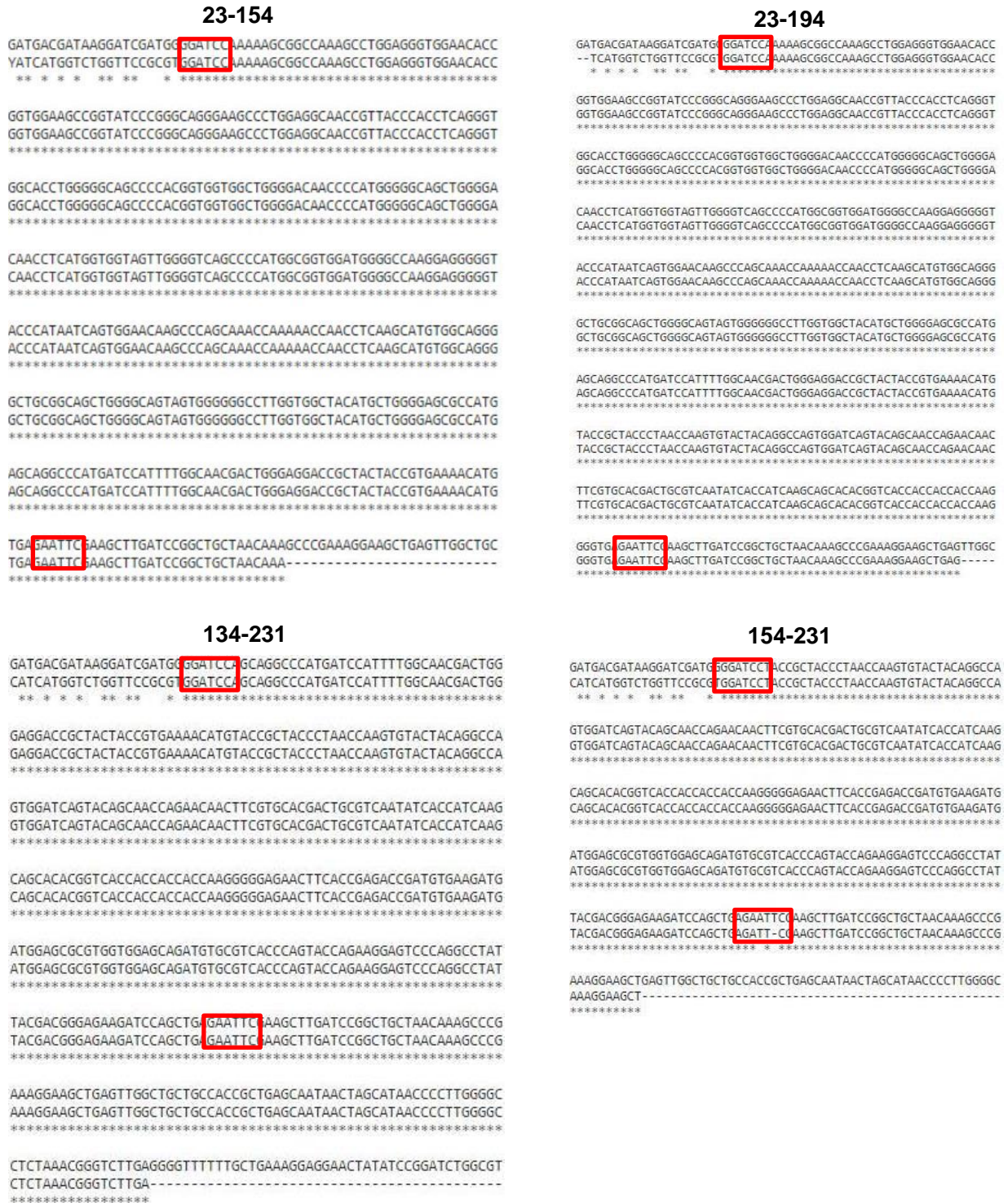


FIGURA 6 Alinhamento das sequências obtidas após sequenciamento com as sequências originais (obtidas em banco de dados). Retângulos vermelhos mostram os sítios de restrição das enzimas BamHI (GGA TTC) e EcoRI (GAA TTC).

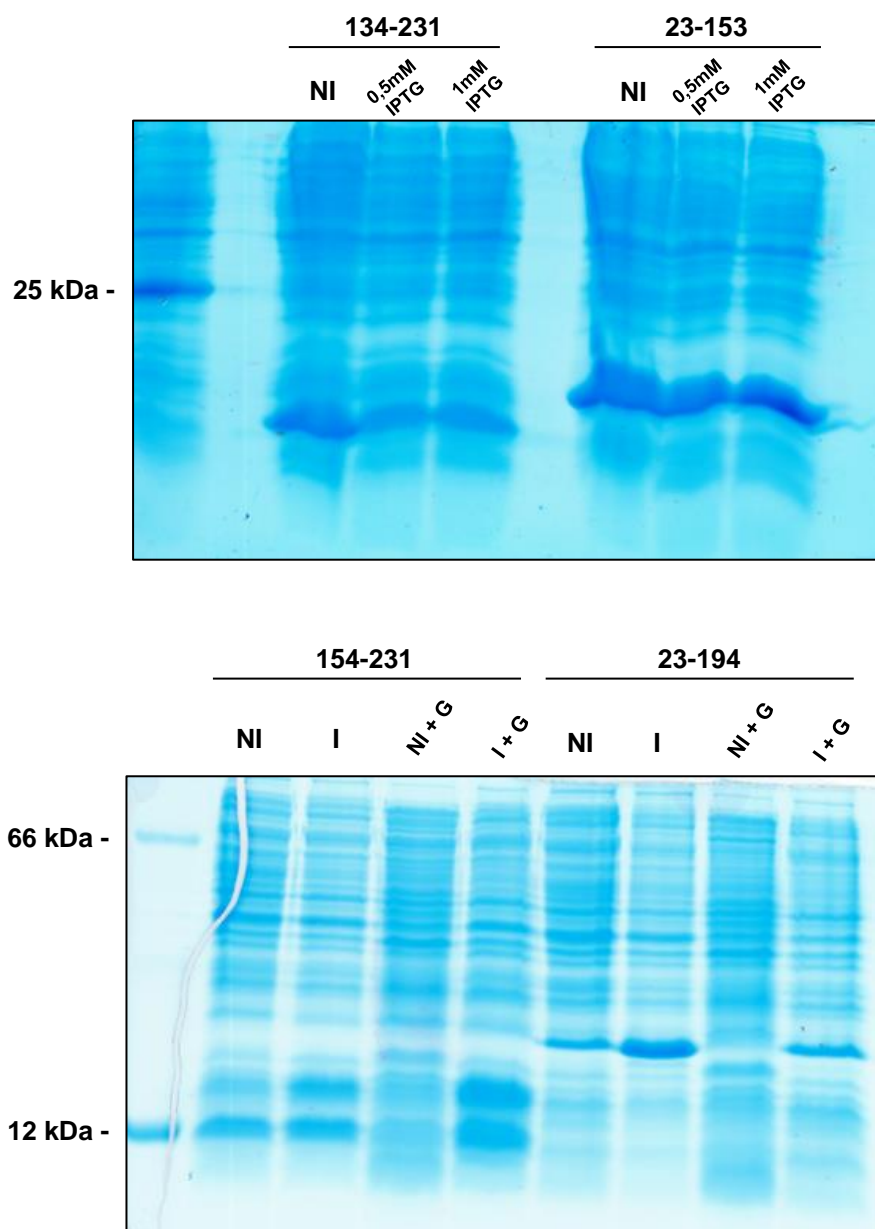


FIGURA 7 – Mini-expressão dos domínios 23-153, 23-194, 134-231 e 154-231. Para controlar os níveis basais de expressão, foi adicionado D-glucose na concentração final de 1% (m/v) ao meio de cultivo de bactérias. (NI = Não-induzido; I = Induzido; NI + G = Não-induzido + D-glucose 1%; e I + G = Induzido + D-glucose 1%).

Apesar da expressão dos domínios no controle-negativo, que pode ser reflexo das características da linhagem bacteriana utilizada (outras linhagens não foram testadas), as bandas correspondentes aos domínios estão situadas na altura esperada, de acordo com a TABELA 2. Dessa forma, para ter a certeza de que a proteína sendo expressa tratava-se da proteína de interesse, as amostras da mini-expressão dos domínios 134-231 e 23-154 foram separadas novamente por *SDS-PAGE* para realização de *Western-blotting* com anticorpos α -PrP^C policlonais (FIGURA 8). O mais adequado seria a utilização de anticorpos α -His tag. Entretanto,

este anticorpo não se encontrava disponível. A revelação do *Western-blotting* demonstrou que as bandas de maior intensidade observadas na FIGURA 6 tratavam-se dos domínios estruturais de PrP^C.

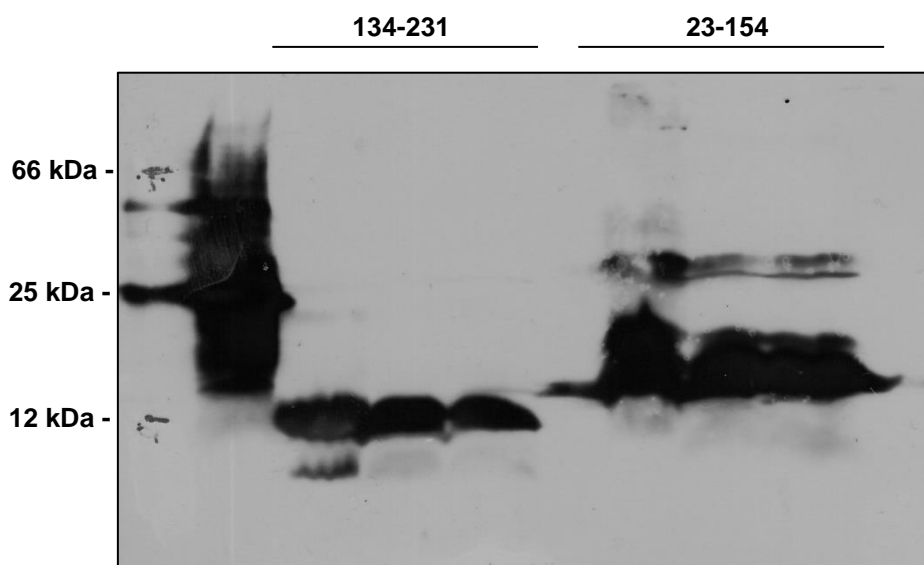


FIGURA 8 – Amostras obtidas da mini-expressão dos domínios 134-231 e 23-154 foram separados novamente por *SDS-PAGE* a 15 % para realização de *Western-blotting* com anticorpos α -PrP^C policlonais.

Em seguida, foi avaliado se os domínios estavam sendo expressados nas frações solúveis ou insolúveis, antes de iniciar a purificação em larga escala. Esta etapa foi feita apenas com o domínio 23-154. Os demais domínios ainda serão avaliados. Após a indução e lise das bactérias em sonicador, as frações solúveis e insolúveis foram separadas por *SDS-PAGE* e analisadas após coloração com Azul de Coomassie. A FIGURA 9 demonstra que o domínio 23-154 estava totalmente presente na fração insolúvel (*pellet*).

Após esta observação, iniciou-se o processo de purificação do domínio 23-154 (FIGURA 9) como descrito no item 4.6 dos MATERIAIS E MÉTODOS. O rendimento da purificação foi de 3,4 mg/mL. O baixo rendimento pode ser explicado pela alta insolubilidade observada do domínio estrutural 23-154 que, mesmo após a utilização do tampão desnaturante, ainda sim foi possível observar a presença da proteína no *pellet* (Linha P, FIGURA 10). Talvez, a utilização de um volume maior de meio de cultivo, em relação ao que foi utilizado (100ml), e modificações no tampão desnaturante possam aumentar o rendimento da proteína.

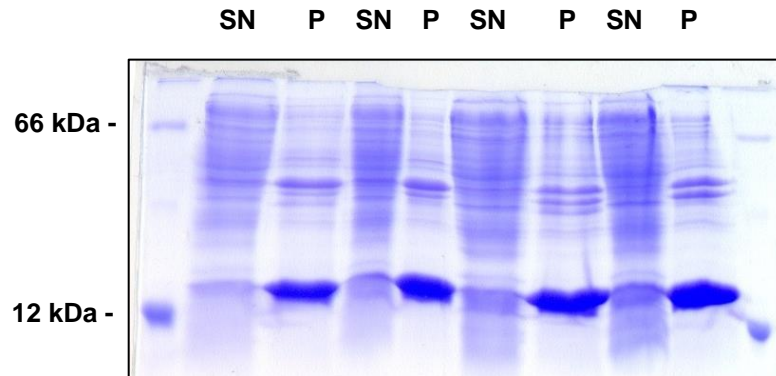


FIGURA 9 – Avaliação das frações solúveis e insolúveis, após expressão do domínio 23-154 em bactérias da linhagem BL21 (DE3) Star. As amostras foram separadas por *SDS-PAGE* e, em seguida, o gel foi corado com Azul de Coomassie. (SN= Sobrenadante; P = *Pellet*).

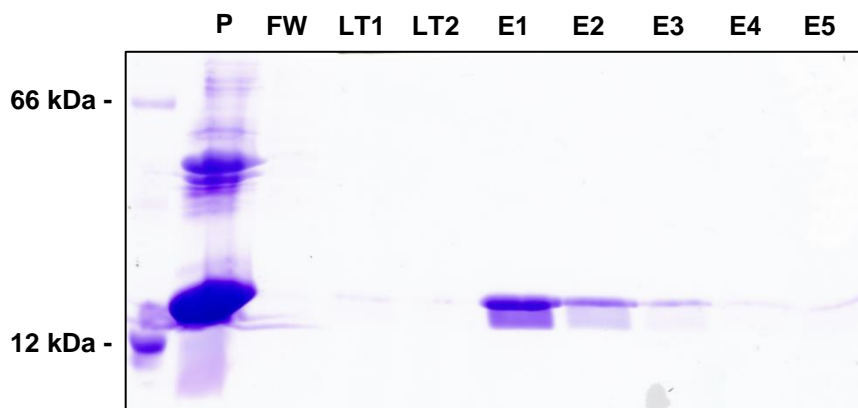


FIGURA 10 – Purificação do domínio 23-154 por meio de cromatografia de afinidade. (P = *Pellet*; FT = *Flowthrough*; LT1 = *Lavagem com tampão 1*; LT2 = *Lavagem com tampão 2*; E1, 2, 3, 4 e 5 = *Eluatos*).

O objetivo principal da produção dos domínios isolados de PrP^C seria a utilização destes em ensaios de interação com a proteína CHIP/Stub1. Gimenez *et al* (2015) demonstraram, por meio de co-imunoprecipitação e *pull-down*, que PrP^C e CHIP/Stub1 são capazes de interagir. Ao utilizar a proteína PrP^C com regiões deletadas nestes ensaios de interação, seria possível identificar, na molécula de PrP^C, o domínio importante para interagir com CHIP/Stub1. Por exemplo, se o domínio 23-153 não interagir com CHIP/Stub1 nos ensaios, significa que a região envolvida na ligação está presente na outra parte da molécula que foi deletada (no caso, entre os aminoácidos 154-231).

É possível que a região de PrP^C envolvida na ligação esteja presente em seu domínio hidrofóbico (entre os aminoácidos 112-133). Esta suposição pode ser feita, pois CHIP/Stub1 é homóloga a STI1 (*Stress-inducible protein 1*), co-chaperona

que possui função antagônica a primeira (MULLER *et al.*, 2013). A ligação de STI-1 na molécula de PrP^C ocorre no domínio hidrofóbico, entre os aminoácido 113-128, resultando em neuroproteção (ZANATA *et al.*, 2002). Portanto, é possível que CHIP/Stub1 ligue-se à PrP^C em resíduos próximos ao de STI-1.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho de conclusão de curso buscou contribuir para o estudo da interação entre as proteínas, PrP^C e CHIP/Stub1. Esta contribuição seria realizada por meio da expressão e purificação de domínios estruturais de PrP^C.

Dos 5 domínios inicialmente planejados (23-94, 23-153, 23-194, 134-231 e 154-231), apenas 1 foi expressado e purificado, o domínio 23-153. Além disso, o rendimento da purificação deste domínio não foi satisfatório e, por isso, mudanças nos protocolos utilizados durante a realização do trabalho são necessárias. Tais mudanças poderiam ser feitas em relação à linhagem de bactérias utilizadas, composição do tampão para solubilização das proteínas e volume do meio de cultura utilizados na expressão. Após estas modificações, será possível, talvez, a expressão e purificação dos domínios que serão utilizados como ferramentas para determinar a região de PrP^C envolvida na interação com CHIP/Stub1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUZZI, A.; BAUMANN, F.; BREMER J. **The Prion's Elusive Reason for Being.** *Annual Review of Neuroscience*, vol.31, pp 439-477, 2008;doi:10.1146/annurev.neuro.31.060407.125620.

BALLINGER, C. A.; CONNEL, P.; WU, Y.; HU, Z.; THOMPSON, L. J.; YI L-Y.; PATTERSON C. **Identification of CHIP, a Novel Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein That Interacts with Heat Shock Proteins and Negatively Regulates Chaperone Functions.** *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 19, no 6, pp 4535-4545, June 1999.

BÉLAND, M. & ROUCOU, X. **The prion protein unstructured N-terminal region is a broad-spectrum molecular sensor with diverse and contrasting potential functions.** *Journal of Neurochemistry*, vol. 120, 853-868, 2012.

BENDHEIM, P. R.; BROWN, H. R.; RUDELI, R. D.; SCALA, L. J.; GOLLER, N. L.; WEN, G. Y.; KASCSAK, R. J.; CASHMAN, N. R.; BOLTON, D. C. **Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein.** *Neurology*, Vol. 42, no. 1, pp 149-156, 1992.

BUELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, R. A.; AUTENRIED, P.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. **Mice devoid of PrP are resistant to Scrapie.** *Cell*, Vol. 73, 1339-1347, July 2, 1993.

BUELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H.P.; DeARMOND, S. J.; PRUSINER, S. B.; AGUET, M.; WEISSMANN C. **Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cel-surface PrP protein.** *Nature*, Vol 356, 16 April 1992.

CHAKRABARTI, O.; ASHOK, A.; HEGDE, R. S. **Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration.** *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 34, no 6, 287-295, 2009.

CHANDLER, R.L. **Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material.** Lancet; 1: 1378-1379. 1961.

COLLINGE, J. **Molecular Neurology of Prion Disease.** Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, vol. 76, pp 906-919, 2005; doi:10.1136/jnnp.2004.048660.

CULLIE J & CHELLE, P.L. **Transmission experimentale de la tremblante a la chevre.** C R Acad Sci (Paris);208: 1058-1060, 1939.

DIAMANT, H.; ZHU, L.; KIBUUKA, L. N.; FAN Z.; HYMAN, B. T.; McLEAN, P. J. **Direct Visualization of CHIP-mediated Degradation of Alpha-Synuclein *in vivo*: Implications for PD Therapeutics.** PlosOne.Vol. 9, Issue 3, March 2014.

DICKEY, C. A.; PATTERSON, C.; DICKSON D.; PETRUCELLI, L. **Brain CHIP: removing the culprits in neurodegenerative disease.** *TRENDS in Molecular Medicine*, Vol. 13, No 1, pp 32-38, 2007. doi:10.1016/j.molmed.2006.11.003

EVANS, G.B. E.; PUSHIE, M. J.; MARKHAM, K. A.; LEE, H-W.; MILHAUSER, G. L. **Interaction between Prion Protein's Copper-Bound Octarepeat Domain and a Charged C-Terminal Pocket Suggests a Mechanism for N-Terminal Regulation.** Structure 24, 1057-1067, July 6, 2016.

GAO, X. & HU, H. **Quality control of the proteins associated with neurodegenerative diseases.** *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Vol 40, pp 612-618, 2008. doi:10.1111/j.1745-7270.2008.00441.x.

GIMENEZ, A. P. L.; RICHTER, L. M . L.; ATHERINO, M. C.; BEIRÃO, B. C. B.; FÁVARO, C.; COSTA, M. D. M.; ZANATA S. M.; MALNIC, B. & MERCADANTE, A. F. **Identification of novel putative-binding proteins for cellular prion protein and a specific interaction with the STIP1 homology and U-Box- containing protein 1.** Prion, 2015. DOI: 10.1080/19336896.2015.1075347.

GRIFFITH, J. S. **Self-replication and Scrapie.** Nature, Vol. 215, September 2, 1967.

JIANG, J.; BALLINGER, C. A.; WU, Y.; DAI, Q.; CYR, D. M.; HOHFELD, J.; PATTERSON, C. **CHIP Is a U-box-dependent E3 Ubiquitin Ligase: Identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation.** The Journal of Biological Chemistry, Vol 276, pp 42938-42944, 2001.

KRISTIANSEN, M.; DERIZIOTIS, P.; DIMCHEFF, D. E.; JACSKON, G. S.; OVAA, H.; NAUMANN, H.; CLARKE, A. R.; VAN LEEUWEN, F. W. B.; MENÉNDEZ-BENITO, V.; DANTUMA, N. P.; PORTIS, J. L.; COLLINGE, J.; TRABRIZI, S. J. **Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome.** *Molecular Cell.* Vol. 26, pp. 175-188, April 27, 2007. Doi: 10.1016/j.molcel.2007.04.001.

KUMAR, P.; AMBASTA, R.K.; VEERESHWARAYYA, V.; ROSEN, K.M.; KOSIK, K.S.; BAND, H.; MESTRIL, R.; PATTERSON, C.; QUERFURTH, H.W. **CHIP and HSPs interact with beta-APP in a proteasome-dependent manner and influence Abeta metabolism.** Hum Mol Genet. Vol.16, no.7, pp 848-864, 2007.

LIBERSKI, P. P. **Historical overview of prion diseases : a view from afar.** Folia Neuropathol, 50 (1): 1-12, 2012.

LINDEN, R.; MARTINS, V. R.; PRADO, M. A. M.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; BRENTANI, R. R. **Physiology of the Prion Protein.** Physiologic Reviews, vol. 88, no.2, pp 673-728, 2008. doi: 10.1152/physrev.00007.2007.

MA, J. & LINDQUIST, S. **Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation.** PNAS. vol. 98. no. 26. pp. 14955-14960. December 18, 2001.

MA, J.; WOLLMANN, R.; LINDQUIST, S. **Neurotoxicity and Neurodegeneration When PrP Accumulates in the Cytosol.** Science, Vol 298, 29 November 2002.

MAYER M.P & BUKAU B. **Hsp70 chaperones: Cellular functions nad molecular mechanism.** CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 62 (2005) 670–684. DOI 10.1007/s00018-004-4464-6.

MAYEUX, R. **Epidemiology of Neurodegeneration.** Annu. Rev. Neurosci. 26:81–104, January 24, 2003.

MEYER, R. K.; McKINLEY, M.P.; BOWMAN, K. A.; BRAUNFELD, M. B.; BARRY, R. A.; PRUSINER S. B. **Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 83, pp 2310-2314, April 1986.

MULLER, P.; RUCKOVA, E.; HALADA, P.; COATES, P.J.; HRSTKA, R.; LANE, D.P.; VOJTESEK, B. **C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances.** *Oncogene* v.32, no.25, p 3101-3110, 2013.

PRUSINER, S. B. **Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie.** *Science*, Vol. 216, pp 136-144, 9 April 1982.

PRUSINER, S.B. **Prions.** *Proc Natl Acad Sci, USA*, 95:13363–13383 (1998).

RESTELLI, E.; FIORITI, L.; MANTOVANI, S.; AIRAGHI, S.; FORLONI, G.; CHIESA, R. **Cell Type-Specific Neuroprotective Activity of Untranslocated Prion Protein.** *PLoS One*, vol. 5, no.10, e13725, 2010.

SOTO, C. & CASTILLA, J. **The Controversial Protein-Only Hypothesis of Prion Propagation.** *Nature Medicine*. Vol. 10, S63-S67, 2004; doi:10.1038/nm1069.

SHAO, J.; CHOE, V.; CHENG, H.; TSAI, Y. C.; WEISSMAN, A. M.; LUO, S. & RAO H. **Ubiquitin Ligase gp78 targets unglycosylated prion protein PrP for Ubiquitylation and Degradation.** *Plos One*. Volume 9, Issue 4, April 2014.

WANG X; BOWERS S. L.; WANG F.; PU X-A; NELSON R. J. & MA J. **Cytoplasmic prion protein induces forebrain neurotoxicity.** *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1792, pp 555-563, 2009.

YEDIDIA, Y.; HORONCHIK, L.; TZABAN, S.; YANAI, A.; TARABOULOS, A. **Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein.** The EMBO Journal. Vol.20, No. 19 pp . 5383-5391, 2001.

ZANATA, S.M.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; HAJJ, G.N.; CHIARINI, L.B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A.R.; CABRAL, A.L.; LEE, K.S.; JULIANO, M.A.; DE OLIVEIRA, E.; JACHIERI, S.G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R. **Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection.** EMBO J. v.21, no.13, pp3307-16, 2002.